



P.B.5818 - Patentlaan 2
2280 HV Rijswijk (ZH)
☎ +31 70 340 2040
TX 31651 epo nl
FAX +31 70 340 3016

Europäisches
Patentamt

Zweigstelle
in Den Haag
Recherchen-
abteilung

European
Patent Office

Branch at
The Hague
Search
division

Office européen
des brevets

Département à
La Haye
Division de la
recherche

Audier, Philippe André
Brevalet,
3, rue du Docteur Lancereaux
75008 Paris
FRANCE



Datum/Date

28.05.02

Zeichen/Ref./Réf.

SR 20402 JP/EE

Anmeldung Nr./Application No./Demande n°/Patent Nr./Patent No./Brevet n°.

00912966.9-1214-JP0002012

Anmelder/Applicant/Demandeur/Patentinhaber/Proprietor/Titulaire

Netech Inc.

COMMUNICATION

The European Patent Office herewith transmits as an enclosure the European search report for the above-mentioned European patent application.

If applicable, copies of the documents cited in the European search report are attached.

☒ Additional set(s) of copies of the documents cited in the European search report is (are) enclosed as well.

REFUND OF THE SEARCH FEE

If applicable under Article 10 Rules relating to fees, a separate communication from the Receiving Section on the refund of the search fee will be sent later.





European Patent
Office

**SUPPLEMENTARY
EUROPEAN SEARCH REPORT**

Application Number
EP 00 91 2966

DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category	Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages	Relevant to claim	CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (Int.Cl.7)
X	US 4 987 181 A (DANIEL BICHON ET AL.) 22 January 1991 (1991-01-22) *the whole document*	1-5	C08F246/00 C08F8/00 C08B37/00 A61K31/785
X	WO 91 15252 A (CHEMBIOMED LTD) 17 October 1991 (1991-10-17) * page 18, last paragraph *	1-5	A61P35/00 G01N33/48 C12M3/00 A61L2/16
			TECHNICAL FIELDS SEARCHED (Int.Cl.7)
			C08B A61K A61L
The supplementary search report has been based on the last set of claims valid and available at the start of the search.			
Place of search THE HAGUE		Date of completion of the search 13 May 2002	Examiner Lensen, H
CATEGORY OF CITED DOCUMENTS			
X : particularly relevant if taken alone Y : particularly relevant if combined with another document of the same category A : technological background O : non-written disclosure P : intermediate document		T : theory or principle underlying the invention E : earlier patent document, but published on, or after the filing date D : document cited in the application L : document cited for other reasons & : member of the same patent family, corresponding document	

1

EPO FORM 1503 03 82 (P04C04)

**ANNEX TO THE EUROPEAN SEARCH REPORT
ON EUROPEAN PATENT APPLICATION NO.**

EP 00 91 2966

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned European search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

13-05-2002

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
US 4987181	A	22-01-1991	CH	665954 A5	30-06-1988
			CA	1292687 A1	03-12-1991
			WO	8700060 A1	15-01-1987
			EP	0228387 A1	15-07-1987
			ES	2009207 A6	16-09-1989
			JP	63500079 T	14-01-1988
WO 9115252	A	17-10-1991	AU	7563791 A	30-10-1991
			CA	2080241 A1	11-10-1991
			WO	9115252 A1	17-10-1991
			EP	0524209 A1	27-01-1993

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
US Department of Commerce
United States Patent and Trademark
Office, PCT
2011 South Clark Place Room
CP2/5C24
Arlington, VA 22202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE
in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 14 November 2000 (14.11.00)	
International application No. PCT/JP00/02012	Applicant's or agent's file reference IB1692NET
International filing date (day/month/year) 30 March 2000 (30.03.00)	Priority date (day/month/year) 02 April 1999 (02.04.99)
Applicant YURA, Hirofumi et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

27 October 2000 (27.10.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

☐ was not

made before the expiration of 18 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Kiwa Mpay
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38



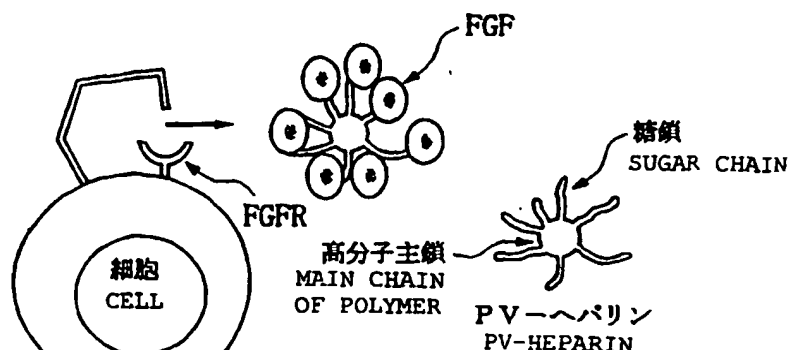
PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類7 C08F 246/00, 8/00, C08B 37/00, A61K 31/785, A61P 35/00, G01N 33/48, C12M 3/00, A61L 2/16</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO00/59967</p> <p>(43) 国際公開日 2000年10月12日(12.10.00)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP00/02012</p> <p>(22) 国際出願日 2000年3月30日(30.03.00)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平11/97062 1999年4月2日(02.04.99)</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 株式会社 ネーテック (NETECH INC.) [JP/JP] 〒213-0012 神奈川県川崎市高津区坂戸3丁目2番1号 KSP東-502 Kanagawa, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および</p> <p>(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 由良洋文 (YURA, Hirofumi) [JP/JP] 〒213-0011 神奈川県川崎市高津区久本3丁目12番 20号-702号 Kanagawa, (JP) 斎藤芳夫 (SAITO, Yoshio) [JP/JP] 〒236-0011 神奈川県横浜市金沢区長浜2丁目6番地19号 Kanagawa, (JP) 石原雅之 (ISHIHARA, Masayuki) [JP/JP] 〒190-0033 東京都立川市一番町6丁目24番地18号 Tokyo, (JP) 小野克明 (ONO, Katsuaki) [JP/JP] 〒359-0035 埼玉県所沢市西新井町17-19-501号 Saitama, (JP)</p>	<p>石川啓一 (ISHIKAWA, Keiichi) [JP/JP] 〒359-1118 埼玉県所沢市けやき台1-19-2-301号 Saitama, (JP)</p> <p>(74) 代理人 園田吉隆, 外 (SONODA, Yoshitaka et al.) 〒135-8073 東京都江東区青木2丁目45番 タイム24ビル4階W-1 Tokyo, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>	

(54) Title: FUNCTIONALIZED GLYCOSAMINOGLYCAN POLYMER AND MEDICAL INSTRUMENTS AND DRUGS BY USING THE SAME

(54) 発明の名称 グリコサミノグリカン機能化高分子及びそれを用いた医療器具並びに医薬



抗腫瘍活性の作用機序

FUNCTION MECHANISM OF ANTITUMOR ACTIVITY

(57) Abstract

Functionalized polymers widely usable in the fields of drugs and medical instruments which are obtained by functionalizing, by organic synthesis, glycosaminoglycan controlling the adhesion, migration and proliferation of cells via binding to various cell growth factors and cytokines or direct interactions with cells. These functionalized polymers are characterized by having a sugar chain involving a structure corresponding to at least a part of the fundamental glycosaminoglycan skeleton introduced into the main chain of a vinyl polymer.

(57)要約

本発明は、各種細胞成長因子やサイトカインとの結合、あるいは細胞との直接的相互作用を介して細胞の接着、遊走さらには増殖を制御するグリコサミノグリカンをも有機合成的に機能化して医薬ならびに医療器具分野において汎用できる機能化高分子を提供する。本発明の機能化高分子は、ビニル系高分子主鎖に、グリコサミノグリカン基本骨格の少なくとも一部に相当する構造を含む糖鎖を導入したことを特徴とする。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦	DM ドミニカ	KZ カザフスタン	RU ロシア
AG アンティグア・バーブーダ	DZ アルジェリア	LC セントルシア	SD スーダン
AL アルバニア	EE エストニア	LI リヒテンシュタイン	SE スウェーデン
AM アルメニア	ES スペイン	LK スリ・ランカ	SG シンガポール
AT オーストリア	FI フィンランド	LR リベリア	SI スロヴェニア
AU オーストラリア	FR フランス	LS レソト	SK スロヴァキア
AZ アゼルバイジャン	GA ガボン	LT リトアニア	SL シェラ・レオネ
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB 英国	LU ルクセンブルグ	SN セネガル
BB バルバドス	GD グレナダ	LV ラトヴィア	SZ スワジランド
BE ベルギー	GE グルジア	MA モロッコ	TD チャード
BF ブルキナ・ファソ	GH ガーナ	MC モナコ	TG トーゴ
BG ブルガリア	GM ガンビア	MD モルドヴァ	TJ タジキスタン
BJ ベナン	GN ギニア	MG マダガスカル	TM トルクメニスタン
BR ブラジル	GR ギリシャ	MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR トルコ
BY ベラルーシ	GW ギニア・ビサウ		TT トリニダード・トバゴ
CA カナダ	HR クロアチア	ML マリ	TZ タンザニア
CF 中央アフリカ	HU ハンガリー	MN モンゴル	UA ウクライナ
CG コンゴ	ID インドネシア	MR モリタニア	UG ウガンダ
CH スイス	IE アイルランド	MW マラウイ	US 米国
CI コートジボアール	IL イスラエル	MX メキシコ	UZ ウズベキスタン
CM カメルーン	IN インド	MZ モザンビーク	VN ヲトナム
CN 中国	IS アイスランド	NE ニジェール	YU ユーゴスラヴィア
CR コスタ・リカ	IT イタリア	NL オランダ	ZA 南アフリカ共和国
CU キューバ	JP 日本	NO ノルウェー	ZW ジンバブエ
CY キプロス	KE ケニア	NZ ニュー・ジーランド	
CZ チェッコ	KG キルギスタン	PL ポーランド	
DE ドイツ	KP 北朝鮮	PT ポルトガル	
DK デンマーク	KR 韓国	RO ルーマニア	

明細書

グリコサミノグリカン機能化高分子 及びそれを用いた医療器具並びに医薬

発明の分野

本発明は、各種細胞成長因子やサイトカイン等と結合して細胞増殖等を制御する作用を持つ天然多糖類であるグリコサミノグリカンの構造をビニル系高分子に導入した新規な高分子材料、並びにその医療への応用に関する。

発明の背景

ヘパリン／ヘパラン硫酸（HS）、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、ケラタン硫酸、ヒアルロン酸などのグリコサミノグリカン（GAG）と呼ばれる酸性多糖類群は、コア蛋白質と共有結合的に集合化しプロテオグリカン（PG）として結合組織や細胞膜などに存在している。PGは他の細胞接着性の蛋白質とともに細胞外マトリックスを構成し、細胞が生存し生物学的機能を果たすために広く分布している。特に、ヘパラン硫酸プロテオグリカン（HS-PG）はほとんどの動物組織に存在し、細胞の接着、形態形成、機能維持に極めて重要な役割を果たしている。

また、PGに含まれるヘパリン／HSは、様々な細胞成長因子と相互作用し、細胞の分化や増殖を制御することに深く関わっていることが明らかになってきた。線維芽細胞成長因子（FGF）はヘパリン／HSと高親和性を有するFGFファミリー（現在FGF1～FGF10程度まで報告されている）を構成しており、そのタイプによって血管内皮細胞、カボジ肉腫細胞、表皮角化細胞等に特異的に作用する。これらのFGFの活性は、細胞表面のFGF受容体（FGFR）と特異的に結合することによって起こ

るものと考えられている。即ち、図 1 に模式的に示すように、膜を貫通して存在するヘパリン／H S は細胞の近傍で不安定な F G F 分子を安定な状態で保持・蓄積し、蛋白質分解酵素や酸化的分解から F G F を保護しながら必要に応じて細胞の受容体 (F G F R) への結合をサポートするものである。F G F が F G F R に結合することにより増殖シグナルが送られて細胞増殖が促進されることになる。このような作用は、ヘパリン／H S が存在しなければ F G F と F G F R とが結合できないことを示唆した多くの研究によって証明されている (例えば、M. Ishihara, Glycobiology, 4, 817-824 (1994) 参照)。

ヘパリン／H S はカルボキシル基を有するウロン酸とアセチル基を有するグルコサミンとを含む二糖類の繰り返し構造によって構成されており、分子内に存在するヒドロキシル基とアミノ基が様々な割合で硫酸化されているのが大きな特徴である。二糖類の硫酸化のタイプは約 10 程度が同定されており、これらの硫酸化の違いによってヘパリンと H S とに分類される。また、細胞は、その種類や状態に応じて硫酸化の程度やその分子鎖長が異なる様々なタイプのヘパリン／H S を自ら用意して F G F ファミリーの活性を制御していると考えられている。

上記のように、多様な硫酸化構造を取りうるヘパリン／H S は、F G F の活性を制御する他にも、細胞の遊走や増殖、さらには免疫細胞が関与する炎症作用まで幅広い生体反応に関与しているサイトカイン類の約 80 %、あるいはマトリックス接着分子、代謝関連物質、さらには血液凝固因子等とも相互作用し、生体内で極めて多彩な役割を果たしている。しかしながら、ヘパリン／H S はこのように多機能性であるが故に、その分子全体を用いた場合に不要な副作用等を誘発することがあり、医薬及び医療の分野でのヘパリン／H S の利用は制限されていた。

一方、ヘパリン／H S の多彩な機能は、その分子鎖長によって

劇的に変化することも知られている。例えば、血液凝固を阻害するアンチトロンビン I I I は、ヘパリン／H S に含まれる 3-O-硫酸基を有する特徴的な構造ドメインに結合するが、抗凝固活性を発現するためにはこれを含む 5 糖配列以上が必須であり、現実には低分子化は著しい活性低下を余儀なくさせる。また、F G F 1 及び F G F 4 の活性発現には、2-O-硫酸基と 6-O-硫酸基を豊富に含む 10 糖配列以上の構造ドメインが必要である。

近年、ヘパリン／H S の多様な複合機能のなかでも細胞成長因子活性のみを制御することを目的に、ヘパリン／H S の分子の活性ドメインを酸化的に断片化したヘパリノイドとして利用することが試みられた (M. Ishihara, 他、J. Biol. Chem. 268, 4675-4683 (1993))。しかしながら、これらの研究では、ヘパリノイド断片による各種成長因子の活性の制御が不十分であり、所望の活性を維持するためにヘパリノイドの濃度を増加させることにより出血傾向等の副作用を誘発する問題があった。

さらに、ヘパリン／H S を含む G A G 類を種々の分野で応用するためには、ポリスチレンやポリカーボネートのような医療分野で広く用いられている疎水的な樹脂製品に効率よく固定化することが求められるが、G A G 類及びその断片は概して水溶性が高く、各種樹脂製品に良好に吸着・固定化することは困難であり、例えば、G A G 類を診断用ビーズや培養皿に適用し、医学的基礎研究や臨床医療に汎用的に応用することが困難であった。

発明の概要

本発明者らは、上記の課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、ビニル系高分子主鎖に、グリコサミノグリカン基本骨格の少なくとも一部に相当する構造を含む糖鎖を導入したことを特徴とする機能化高分子とすることにより、副作用を伴わず所望の活性のみを十分に発揮できるとともに、特に医学分野で利用されている

疎水的な樹脂製品に対して容易かつ高密度に吸着・固定化できることを見だし、本発明を完成するに至った。

本発明の機能化高分子は、ビニル系高分子を主鎖とし、当該主鎖にグリコサミノグリカン（G A G）基本骨格の少なくとも一部に相当する構造を含む糖鎖を導入した構造を有する。即ち、本発明の機能化高分子は、一分子中にG A G類の活性ドメインを少なくとも一つ、好ましくは複数個含有することにより、その活性ドメインが有する生理活性、例えばヘパリン／H S類では特に、各種細胞成長因子やサイトカインに対する相互作用が一層強化されている。

また、本発明は前記機能化高分子で表面を修飾した医療器具も提供する。このような医療器具は、表面にG A G類が固定化されているため、例えば細胞培養や診断用器具として有用である。

さらに、本発明の機能化高分子は、G A G類の細胞成長抑制効果に基づく医薬、特に抗腫瘍剤を含む細胞成長制御薬も提供する。

図面の簡単な説明

図1は、細胞増殖のメカニズムを説明する模式図である。

図2は、本発明の抗腫瘍剤の作用機序の一例を示す模式図である。

図3は、実施例1におけるゲル濾過パターンを示すグラフである。

図4は、実施例2における本発明の機能化高分子の吸着性を示すグラフである。

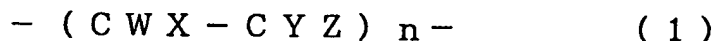
図5は、実施例3における本発明の機能化高分子を介した細胞成長因子の接着性を示すグラフである。

好ましい実施態様の詳細な説明

以下、本発明の機能化高分子についてさらに詳細に説明する。

本発明の機能化高分子の主鎖として用いられるビニル系高分子は、重合性のモノマーから構成され、例えば、化学便覧（561頁、応用化学編Ⅰ、日本化学会、丸善（昭和61年））に記載された付加重合系、縮重合系、重付加系、付加縮合系、開環重合系のモノマーから任意に選択したモノマーを含むホモポリマー又はコポリマーでよく、特に限定されない。好ましくは、少なくとも1つの不飽和結合を有する付加重合系のモノマー、例えばエチレン、プロピレン、スチレン、酢酸ビニル、アクリル酸、アクリルアミド等のポリマーが挙げられ、それらは任意に置換されていてもよい。

このような高分子主鎖にグリコサミノグリカン基本骨格の少なくとも一部に相当する構造を含む糖鎖が結合している。即ち、本発明の機能化高分子は、下記一般式（1）で表される単位を少なくとも1つ含む。



上記式中、Wは糖鎖を表し、X、Y及びZは水素原子を含む任意の置換基を表し、nは1以上の繰返し単位数を示す。

本発明の機能化高分子を構成する糖鎖は、ヘパリン／HS、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、ケラタン硫酸などのGAG類を構成する基本骨格の少なくとも一部に相当する構造を有し、その構成二糖体の数が2～50個以上、より好ましくは4～25個の二糖類以上の糖類、オリゴ糖類もしくは多糖類であって、その構成二糖体が平均1個以上の硫酸基を有するものである。例えば、ヘパリン／HSに含まれる3-O-硫酸基を有する特徴的な構造ドメインに相当する5糖配列以上からなる糖鎖は、血液凝固を阻害するアンチトロンビンⅢと特異的に結合し、2-O-硫酸基と6-O-硫酸基を豊富に含む10糖配列以上の構造ドメインに相当する糖鎖はFGF1及びFGF4の活性発現に関与する。

前記糖鎖は、N-硫酸基を選択的に脱硫酸化した修飾体や化学的に合成したものでも天然のものでもよい。ただし、天然グリコサミノグリカンの化学分解によって得られる分解糖鎖であり、当該分解糖鎖が、その化学分解によって生じた官能基を介して高分子主鎖に結合しているのが製造上好ましい。

これらの天然グリコサミノグリカンとしては、ヘパリン／HS、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、ケラタン硫酸などのGAG類等が挙げられるが、特に構成糖の硫酸化のパターンが豊富なヘパリン／HSがより好適に用いられるが、他のGAG類でも何ら支障はない。また、セルロース、アミロース、ラミナラン、アガロース、カラゲナン、イヌリン、レバン、キシラン、マンナン、キチン、ヘクチン、アミロヘクチン、ガラクトン、トリチシン、アラビナン、コロミン酸などのホモ多糖類や、グルコマンノグリカン、ガラクトグルコマンノグリカン、グアゴム、アラビノガラクトグリカン、アラビアゴム、トラガント酸、アルギン酸などのヘテロ多糖類に対し酵素的あるいは化学合成的に硫酸基を導入したものをを用いてもよい。

前記天然グリコサミノグリカンの化学分解は、例えば、上記の多糖類を、pH 6.5～8.0以外の非生理的な条件、好ましくはpH 5以下またはpH 10以上の酸及び／またはアルカリ性領域で、亜硝酸や過ヨウ素酸などを用いて糖鎖結合を切断して分画糖鎖を得ることによって好ましく調製される。また、ヘパラーゼ、ヘパリチナーゼ、コンドロイチナーゼ、ケラターゼなどの選択的な糖鎖分解酵素や、場合によっては、熱、プラズマ放電、あるいはラジカル反応性試薬に基づく化学的な分解等で得られた分画糖鎖を用いることもできる。

本発明の機能化高分子における糖鎖は、共有結合によって高分子主鎖に結合している。その結合は特に限定されることはなく、高分子主鎖及び糖鎖が有する官能基の組み合わせに従って、適当

な反応条件で、任意に触媒などを用いて両者の官能基同士をカップリングさせる。また、高分子主鎖を構成するモノマーと糖鎖とを結合させて糖鎖誘導モノマーとし、そのモノマーを重合させても、反応性基を有する高分子に糖鎖を結合させてもよいが、一分子中の糖鎖含有量を調節できることから、糖鎖誘導モノマーを重合するのが好ましい。中でも、分画された親水性の糖鎖を疎水性のモノマー単位に導入し、それを重合して得られた機能化高分子は、一つの分子中に高密度の糖鎖を有する水溶性のポリマーでありながら疎水性の樹脂製品に容易に吸着できる特性を有する。

本発明の機能化高分子における糖鎖の導入は、該高分子を構成するアミノ基を有するモノマーに対して、例えば、化学的に分解されたG A G類に生成したアルデヒド基やカルボニル基を介したシッフ結合により行うことができる。さらには、酸クロリド基、N-ヒドロキシコハク酸イミドエステル基、あるいはエポキシ基などを有するカップリング剤をビニルモノマーと糖鎖の官能基とを結合する方法等のいずれも好適に用いられ得る。特に、化学的な分解によってG A G類に生成したアルデヒド基を用いる方法は、簡便でG A G類の活性を保存しやすいという点で、より好適に用いることができる。

かくして、本発明によれば、天然のG A G類の活性ドメインを一分子中に複数個含有することにより、その活性ドメインが有する生理活性、ヘパリン／H S類では特に、各種細胞成長因子やサイトカインに対する相互作用を、より一層強化したG A G誘導機能化高分子が提供される。

従って、本発明の機能化高分子は、高分子主鎖に基づく疎水性により、医療用に広く用いられている合成樹脂製品、例えばポリスチレン、ポリカーボネート、ポリアミド、ポリスルホン、ポリエステル製品などの疎水的樹脂表面に吸着し表面を改質するので、これらの製品表面の組織適合性や血液適合性を向上させるこ

とができる。さらに、これらの樹脂製品で構成されるマイクロ微粒子や培養皿あるいは検査用プレートにコーティングされ、糖鎖を介した細胞成長因子の定量や効率的な細胞培養などを可能にする。

よって本発明は、上記機能化高分子でポリスチレンやポリカーボネートなどの疎水的樹脂表面を修飾した医療器具も提供する。このような医療器具は、シャーレ、プレート、ビーズなどの器具表面に本発明の機能化高分子水溶液を適用し乾燥させることによって容易に製造することができ、その表面には、高密度にG A G類が吸着・固定化されている。例えば、微小樹脂ビーズに本発明の機能化高分子をコーティングした場合は、効率よく各種細胞成長因子を結合させ、これらが関わる病態をスクリーニングする診断用器具となり、樹脂製培養皿にコーティングした場合は効果的に細胞の成長を制御する培養システムとなるため、基礎医学や各種臨床分野で幅広く利用することができる。

また、コンドロイチン硫酸やデルマトン硫酸は、構造そのものに細胞接着抑制機能が存在するので、冠動脈拡張術後の再狭窄防止のための血管やステントの表面処理剤としても有効である。

さらに、本発明の機能化高分子は、遊離の状態で各種細胞成長因子と強く結合でき、腫瘍組織中で癌細胞が増殖するために用いられている細胞成長因子やサイトカイン、血管成長因子やF G F類を選択的に吸収して癌細胞や血管内皮細胞の成長を阻害し腫瘍の成長を抑制する。よって本発明は、上記機能化高分子からなる細胞成長制御薬、特に抗腫瘍剤(抗癌剤)も提供する。例えば、急性リンパ性白血病等の血液癌では、増加した癌細胞の一部が分解されて血流に障害を起こし、腎不全等を惹起することが知られているが、その際にヘパリン等が点滴されて血流が保全される。このとき芽球化した癌細胞が一時的に減少することがしばしば観察され、この現象はヘパリンによる増殖抑制作用によるものと

考えられる。即ち、ヘパリン類似活性ドメインを複数具備している本発明の抗腫瘍剤は、固形癌のみならず白血病等の血液癌の治療にも有効であることは明らかである。

特に、本発明の機能化高分子は疎水性高分子主鎖に親水性（水溶性）の糖鎖が複数結合しているため、水溶液中では高分子主鎖をコアとし、その周囲に糖鎖を広げた形で存在しているものと思われる（図2、ポリビニル化ヘパリン（PV-ヘパリン））。従って、このような構造を持つ機能化高分子（抗腫瘍剤）は、図2に模式的に示すように、細胞近傍に存在するFGF等を捕捉・吸収し、それらのレセプターへの結合を阻害するものと考えられる。よって、本発明の抗腫瘍剤は、細胞に対する毒性に基づくものではなく、主として血管成長因子を吸収することによって腫瘍細胞による血管新生を阻害し、その結果腫瘍細胞の成長を阻害するという新たな作用機序に従うものと考えられ、従来の抗癌剤のような副作用を示さない安全な抗腫瘍剤として使用することが期待できる。

実施例

以下、本発明を実施例によりさらに詳細に説明する。

実施例1：ポリビニル化ヘパリン類の合成

25gのヘパリンナトリウム（Scientific Protein Laboratories, USA 製）を過ヨウ素酸を添加した酢酸緩衝液400ml（0.1M、pH5）に溶解し、5℃以下で数日間攪拌した。これに、20mlのグリセロールを添加し、さらに数時間攪拌した後、反応液を2日間透析し脱塩した。回収した反応液に水酸化ナトリウムを添加することによってpHを7.5とし、21gの反応物を得た。このうち10gを分取し、水酸化ナトリウムでpH12に調整した水溶液を作成し、室温で数時間攪拌した。反応液に対し、上記と同様の透析操作を行った後、ゲル濾過カラム（Bio-Gel、Bio-Ra

d 製)を用いて低分子ヘパリンを分画し、ビッターらによるカルバゾール定量法(T. Bitter, and H. A. Muir, Anal. Biochem., 4, 330-334 (1962)) から、20糖鎖を分子量の中心に有する過ヨウ素酸分解ヘパリン(以下、I-20という)を得た。

上記の未処理のヘパリンナトリウム1gを10mlの水に溶解させ、1N希塩酸でpH2以下に調整した。調製されたヘパリン溶液に20mgの亜硝酸ナトリウムを添加し、2時間反応させた。2日間の透析後、ゲル濾過カラム(Bio-Gel, Bio-Rad 製)を用いて低分子ヘパリンを分画した。分画されたそれぞれの糖鎖を、上記のカルバゾール法で定量し、6、8、10、及び12糖鎖の亜硝酸分解ヘパリン(以下、各々N-6、N-8、N-10、N-12という)を得た。

小林らの方法(K. Kobayashi, 等, *Plym. J.*, 17, 567-575 (1985)) に準じて ビニルベンジルアミンを合成した。得られたI-20、N-6、N-8、N-10、またはN-12の各300mgずつを、各々10mlのテトラエチルメチレンジアミン緩衝液(TEMED、pH5)に溶解し、それぞれのTEMED溶液に300mgのビニルベンジルアミンを添加した。調製された溶液に、30mgのシアノ水素化ホウ素ナトリウム水溶液を加えて室温で24時間攪拌した。反応溶液を透析によって脱塩し、不溶解物を濾過した後に凍結乾燥し、糖鎖(I-20、N-6、N-8、N-10、及びN-12)を誘導したビニルモノマーを得た。

得られた糖鎖誘導ビニルモノマーを3mlの水に溶解し、ペルオキシ二硫酸カリウム4mgを添加した。脱気後、窒素置換をしてから密封し、63℃で一晩反応させた。反応溶液をメタノールに滴下し生成物を沈殿させ、沈殿物を濾過し回収した。回収物を水に再度溶解させ透析を行い、限外濾過(YM10、分画分子量1万、アミコン社製)によって未反応物を除去し、凍結乾燥により精製されたポリビニル化ヘパリン(PV-ヘパリン)を得た。これらのPV

ーヘパリンを、各々、P-I-20、P-N-6、P-N-8、P-N-10、及びP-N-12とする。

実施例2：ポリビニル化N脱硫酸ヘパリン類の合成

10gのヘパリン（ピリニジウム塩）を20mlの蒸留水と380mlのジメチルスルフォキシド(DMSO)混合溶液に溶解させ、50℃で90分間攪拌反応させた。透析後凍結乾燥させて得られたO-硫酸は保存しているがN-脱硫酸化されたヘパリン1gを30mlの10重量%メタノールを含む炭酸ナトリウム溶液(50mM)に溶解させ、氷上で1mlの無水酢酸を加えた後水酸化ナトリウムでpHを7～8に調整した。この操作を30分おきに5回繰り返しN-アセチル化ヘパリンとし、透析後凍結乾燥させた。この反応生成物を実施例1の過ヨウ素酸酸化に基づく高分子化を行い、平均20糖鎖のP-I-DSA20を得た。

実施例3：ポリビニル化コンドロイチン硫酸の合成

0.5gのコンドロイチン硫酸C（生化学工業、鮫軟骨由来）を50mgの硫酸ヒドラジニウムを含む5mlのヒドラジン1水和物に溶解させ、95℃で3.5時間反応させた。部分的ヒドラジン分解された生成物を流水下1日透析後凍結乾燥させ、適当量のヨウ素酸溶液で不純物を酸化除去した。再び流水下2日透析後凍結乾燥した生成物を、実施例1に従って亜硝酸分解し、20糖鎖のP-N-20Cを得た。

実施例4：ポリビニル化デルマタン硫酸の合成

0.5gのコンドロイチン硫酸Cをデルマタン硫酸に変える以外は、実施例3に従って、亜硝酸分解20糖鎖のP-N-20Dを得た。

低分子化ヘパリンを誘導したPV-ヘパリンモノマーの合成

反応は¹H NMRのビニル基由来ピークから、また、モノマーの単独重合による高分子化は、¹H NMRのブロード化とゲル濾過による分子量分画より確認した。例えば、Bio-Gel P-100 (Bio-Rad 製) によるP-I-20、未処理のヘパリン、酸分解I-20のゲル濾過では、均一な高分子化P-I-20、未処理の(native)ヘパリン、過ヨウ素酸分解I-20の順で分画できた。このようなゲル濾過パターンは、全てのタイプのポリビニル化GAG類で確認できた(図3参照)。

実施例5：樹脂製品に対する吸着性

ポリスチレン製の96穴マルチウェル(住友ベークライト社製)にP-I-20と未処理のヘパリンの水溶液を所定濃度添加し、24時間後ポリスチレン表面に吸着した糖濃度を前記のカルバゾール法を用いて評価した。結果を図4に示す。

図4に示されるごとく、本発明のポリビニル化ヘパリン(P-I-20)はポリスチレン表面に効率よく吸着したが、未処理のヘパリンは、樹脂表面にほとんど吸着しなかった。また、P-I-20以外のポリビニル化ヘパリン、例えばP-N-12、P-N-10、P-N-8、及びP-N-6では、0.5 mg/mlの添加濃度において20~80 µg/mlの吸着量が観察された。また、ポリビニル化N-脱硫酸ヘパリン、ポリビニル化コンドロイチン硫酸、およびポリビニル化デルマタン硫酸でもほぼ同一の吸着プロフィールを示した。

さらに、ポリスチレンの他、ポリカーボネート、ポリスルホン、ポリウレタンなどでも、同様の吸着性が確認された。このことから、本発明のポリビニル化ヘパリンは、医療用の樹脂製品にヘパリン分子を吸着・固定化させるための有効な手段であることが示された。なお、本発明に係る機能化高分子は、ガラス製の素材に対しても、このような効率的な吸着性を示した。

実施例 6：ポリビニル化ヘパリンコーティングプレートに対する細胞成長因子の結合

実施例 1 で調製した P-I-20 で処理したポリスチレン製 96 穴マルチウェル（住友ベークライト社製）に、細胞増殖因子（FGF-2、HGF、VEGF₁₆₅）を溶解させた燐酸緩衝液（0.1%ウシ胎児血清加、pH7.2）を 100 μ l 添加し、各細胞成長因子の結合性を P-I-20 をコートしていない未処理のマルチウェルと比較した。

各増殖因子に対する抗体（抗-FGF-2、抗-HGF、抗-VEGF（R&D System 社製）をマルチウェルに結合した成長因子と反応させ、さらに反応した抗体をペルオキシダーゼを標識した抗体と反応させ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ基質（Bio-Rad 社製）を加え発色させた。各増殖因子の結合量は 414 nm の OD 値から見積った。OD 値の変化を図 5（1）、（2）及び（3）に示す。

図 5（1）、（2）及び（3）に示されるように、本発明の P-I-20 で処理されたディッシュでは、細胞成長因子の添加濃度が 500 pg/0.1 ml 以上で、各成長因子の結合に基づくペルオキシダーゼの発色が確認できたが、未処理のディッシュでは結合が観察されなかった。これは、本発明のポリビニル化ヘパリンが、各種増殖因子と特異的に結合できることを示しており、このような増殖因子の結合に基づく発色は、天然のヘパリンの添加によって競争的に阻害された。以上の結果は、本発明のポリビニル化ヘパリンで処理されたプレートは、ガンや創傷などの障害時に増加する細胞成長因子やサイトカインを、簡便かつ高精度に検知することができることを示している。

一方、このような特徴的な増殖因子結合活性は、ポリビニル化 N-脱硫酸ヘパリン、ポリビニル化コンドロイチン硫酸、およびポ

リビニル化デルマタン硫酸類では弱かった。

実施例 7：P V－ヘパリンコーティングディッシュ上での細胞培養

本発明の P－I－20 及び P－N－12 水溶液 (0.5 mg/ml)、さらに 2%ゼラチン、10 μ g/ml ヒトファイブロネクチン溶液でポリスチレン製 96 穴マルチウエルをコーティングし、ダルベッコ変法イーグル培地 (10%ウシ胎児血清添加) に浮遊させた 6,000 個のヒト冠動脈内皮細胞 (CEC) を播種し、細胞成長因子として FGF2 あるいは VEGF165 を添加して、3 日間培養した。培養後、WST-1 試薬 (セルカウンティングキット、同仁堂) を用いて増加した細胞数を計測し、増殖率を評価した結果を表 1 に示す。

表 1 CEC の増殖率

コーティング	成長因子			
	FGF2		VEGF165	
	4 μ g/l	8 μ g/l	4 μ g/l	8 μ g/l
無し	229	286	190	195
P－I－20	392	408	364	404
P－N－12	409	426	360	414
ゼラチン	356	389	335	385
ファイブロネクチン	273	327	371	436

表 1 に示されるがごとく、本発明のポリビニル化ヘパリン上での成長因子依存的な血管内皮細胞の増殖率は、細胞接着蛋白質であるファイブロネクチンと同等以上であることが明らかとなった。このことから、ポリビニル化ヘパリン上で細胞成長因子が安

定に相互作用したために、良好な細胞増殖が維持されたことが示唆された。

実施例 8：ポリビニル化ヘパリンによる細胞成長因子の阻害

実施例 7 の細胞成長因子依存的な C E C を、5 ng/ml の濃度で F G F 2 あるいは V E G F 1 6 5 添加した培地中に浮遊させ、細胞培養用の 9 6 穴マルチウェル（住友ベークライト社製）で培養した。また、培地には、0 から 5 1 2 μ g/ml の濃度で本発明のポリビニル化ヘパリンである P - I - 2 0 と P - N - 1 2、未処理のヘパリン、過ヨウ素酸酸化 I - 2 0、及び亜硝酸分解 N - 1 2 を同時に添加し、細胞増殖への影響を調べた。各細胞成長因子に基づく細胞増殖を 3 0 % 抑制させるのに要したヘパリン関連物質の添加濃度を表 2 に示す。

表 2：成長因子依存的な細胞増殖を 3 0 % 抑制するのに必要な濃度 (μ g / ml)

ヘパリン関連物質	細胞成長因子	
	F G F 2	V E G F 1 6 5
未処理のヘパリン	2 4 8	5 2 0
I - 2 0	5 1 2	3 7 6
N - 1 2	5 2 1	3 8 8
P - I - 2 0	3 5	2 1
P - N - 1 2	4 1	2 9

表 2 に示されるように、本発明のポリビニル化ヘパリンは、溶液状態では効率よく細胞成長因子と相互作用し、細胞の増殖を抑制することが解った。このような細胞成長因子に対する吸収作用は、未処理のヘパリンや単純な低分子化ヘパリンに比べ、少なくとも

10倍以上の活性であることも示された。

この結果は、本発明のポリビニル化ヘパリンが、腫瘍組織中から誘導される細胞成長因子や血管成長因子を効率よく吸収し、腫瘍細胞や血管の成長を効果的に抑制する抗腫瘍剤として利用できることを示している。

次に、2種類の細胞成長因子を添加しないこと以外は前項と同じ条件で培養した、ヒト冠動脈由来平滑筋細胞（SMC）、及びヒト腎臓由来のメサングウム細胞（MGC）の増殖性を調べた。この結果を表3に示す。

表3：成長因子非依存的細胞増殖を45%抑制
するのに要した濃度（ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）

ヘパリン関連物質	細胞	
	SMC	MGC
未処理のヘパリン	28	16
I-20	70	64
N-12	80	70
P-I-20	2	5
P-N-12	3	5

表3に示されるように、少なくとも生体外の培養において細胞成長因子に非依存的に増殖できる平滑筋細胞やメサングウム細胞の増殖も、ポリビニル化ヘパリンの添加によって効果的に抑制された。このような高い増殖抑制効果は、細胞成長因子の他、培地中に含まれているものや細胞が増殖する際に誘導するサイトカイン類も、ポリビニル化ヘパリンとの相互作用によって吸収されたためであることを示している。以上から、本発明のポリビニル化ヘパリンは、腫瘍の成長を抑制する他、循環器の領域における冠動脈拡張術後の再狭窄を予防する材料となりうることも示

唆している。

実施例 9：腫瘍の成長抑制作用

6 から 8 週 齢 の B A L B / C マウスの側腹部の皮下にマウス大腸癌細胞 C o l o n e 2 6 を 10^6 個 注 入 し た 。 2 週 間 後 、 径 5 mm 大 の 腫 瘍 が 形 成 さ れ た の を 確 認 し 、 コ ン ト ロ ー ル と し て 3 例 に 生 理 食 塩 水 の み を 、 他 の 3 例 に 本 発 明 の P - I - 1 4 を 含 む 生 理 食 塩 水 (1 0 mg/ml) を 、 各 々 0 . 1 ml ず つ 、 腫 瘍 付 近 の 皮 下 に 連 日 注 射 し た 。 腫 瘍 の 成 長 の 比 較 を 表 4 に 示 す 。

表 4

腫瘍モデル マウス	腫瘍の状態		
	1 週 間 後	2 週 間 後	3 週 間 後
(腫瘍径 5mm)			
コントロール群	腫瘍径 10-12mm	腫瘍径 20mm以上	腫瘍径 30mm以上
P-I-20投与群	腫瘍径 6-7mm	腫瘍径 10mm	腫瘍径 15mm以下
			部分的腫瘍壊死

表 4 に 示 さ れ る よ う に 、 本 発 明 の ポ リ ビ ニ ル 化 ヘ バ リ ン を 投 与 し た 場 合 、 腫 瘍 の 成 長 が 効 果 的 に 抑 制 さ れ る こ と が 解 っ た 。 さ ら に 、 4 週 間 後 で は 、 コ ン ト ロ ー ル 群 は 癌 悪 液 質 の 状 態 と な り 、 極 度 の 体 重 減 少 、 後 ろ 足 の 麻 痺 、 及 び 毛 並 み の 異 常 が 観 察 さ れ 、 重 篤 な 衰 弱 状 態 を 呈 し た 。 こ れ に 対 し て 本 発 明 の ポ リ ビ ニ ル 化 ヘ バ リ ン (P - I - 2 0) 投 与 群 の 全 身 状 況 は 極 め て 良 好 で あ っ た 。 ま た 、 投 与 群 は 、 腎 機 能 及 び 肝 機 能 (血 中 の ク レ ア チ ニ ン 、 B U N 、 総 ビ リ ル ビ ン 、 G O T 、 G P T 、 総 蛋 白 質 量) が 健 常 な マ ウ ス と 何 ら 変 わ り が 無 く 、 ポ リ ビ ニ ル 化 ヘ バ リ ン 投 与 に よ る と 思 わ

れる副作用は観察されなかった。以上の結果は、本発明のポリビニル化ヘパリンが、固形癌による腫瘍の成長を有効に抑制する抗腫瘍剤（抗癌剤）として用いられることを示している。

実施例 10：ポリビニル化 G A G 類における細胞との相互作用の比較

前記、実施例に基づき各ポリビニル化 G A G 類をコーティングしたディッシュに対する細胞接着の比較を行った。この場合、メサンギウム細胞の代わりにヒト由来皮膚線維芽細胞(SFB)と角化細胞(SKC)を加え比較した。また、CECには、10 ng/ml の hrFGF-2 を添加した。

6 時間後の播種した細胞に対する接着細胞の比率(%)を表 5 に示す。

表 5

コーティング細胞	P-I-20	P-N-12	P-I-DSA20	P-N-20C	P-N-20D
SFB	96	96	88	33	39
SMC	90	95	85	20	22
CEC	99	98	95	5	9
SKC	85	90	80	3	6

表 5 に示されるように、各種機能化グリコサミノグリカン類に対する細胞接着は、ヘパリン類では各細胞とも高い接着を示したが、N-脱硫酸されたものは脱硫酸されないものよりも若干抑制された。一方、コンドロイチン硫酸やデルマタン硫酸では接着が強く抑制された。

上記、細胞接着に加え、7日間に渡る細胞培養を行い、各種機能化グリコサミノグリカン類に対する細胞の増殖性を比較した。増殖性は前記実施例における細胞カウティング試薬に基づく。

D540値で評価した。表6は各素材に対する細胞の増殖性を比較したものである。

表 6

細胞	培養 時間 (Day)	機能化GAG上での細胞増殖率(OD450)				
		P-I-20	P-N-12	P-I-DSA20	P-N-20C	P-N-20D
SFB	1	0.15	0.16	0.04	0.04	0.08
	2	0.25	0.30	0.12	0.12	0.14
	4	0.72	0.82	0.15	0.15	0.25
	7	1.50	1.72	1.63	0.19	0.41
SMC	1	0.14	0.15	0.14	0.08	0.10
	2	0.22	0.23	0.22	0.12	0.18
	4	0.38	0.39	0.42	0.20	0.23
	7	0.41	0.43	0.74	0.25	0.33
CEC	1	0.11	0.12	0.10	0.02	0.02
	2	0.18	0.19	0.17	0.03	0.04
	4	0.32	0.36	0.31	0.03	0.07
	7	0.49	0.50	0.42	0.02	0.10
SKC	1	0.11	0.13	0.13	0.09	0.10
	2	0.18	0.20	0.21	0.12	0.12
	4	0.31	0.37	0.38	0.16	0.28
	7	0.64	0.76	0.81	0.34	0.58

表6に示されるように、ヘパリン系の機能化材料における線維芽細胞、血管内皮細胞、皮膚角化細胞の増殖性が高かったのに対し、デルマトン硫酸、コンドロイチン硫酸系の機能化素材においてその増殖性は低かった。このような増殖性の違いは、各素材に対する接着性と高い相関を示している。一方、ヘパリンは平滑筋

細胞の増殖に対し抑制的に働くことが知られているが、ヘパリン系の機能化材料においてもデルマタン硫酸、コンドロイチン硫酸系の機能化材料と同等の抑制された増殖性を示した。これに対し、N-脱硫酸されたヘパリン系機能化材料は、N-脱硫酸の影響と思われる増殖抑制効果の減少が認められた。

以上から、本発明による機能化GAG類は、細胞増殖因子との結合性が増強されるので細胞増殖を効果的に制御すること、さらには、GAG類の糖鎖構造そのものやGAG類の硫酸基の量や位置などに基づいた細胞接着から増殖の制御が可能となることなどが明らかとなった。

産業上の利用可能性

本発明の機能化材料は、副作用無しにGAGの有する機能を発揮するため、例えば細胞増殖を制御する医薬品として用いられる他、各種プラスチック製品に被覆することが容易になるため医療用素材の改良や用途拡大にも寄与できる。

請求の範囲

1. ビニル系高分子主鎖に、グリコサミノグリカン基本骨格の少なくとも一部に相当する構造を含む糖鎖を導入したことを特徴とする機能化高分子。

2. 前記糖鎖が天然グリコサミノグリカンの化学分解によって得られる分解糖鎖であり、当該分解糖鎖が、その化学分解によって生じた官能基を介して高分子主鎖に結合していることを特徴とする請求項 1 記載の機能化高分子。

3. 前記グリコサミノグリカンが、ヘパリン／ヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸、デルマトン硫酸、あるいはそれらの部分的脱硫酸化修飾体であることを特徴とする請求項 1 または 2 記載の機能化高分子。

4. 前記糖鎖が、2～50個の構成二糖体から構成され、当該構成二糖体が平均1個以上の硫酸基を有するものであることを特徴とする請求項 1 から 3 のいずれかに記載の機能化高分子。

5. 請求項 1 から 4 のいずれかに記載の機能性高分子で表面修飾したことを特徴とする医療器具。

6. 請求項 1 から 4 のいずれかに記載の機能化高分子を含んでなることを特徴とする細胞成長制御薬。

図 1

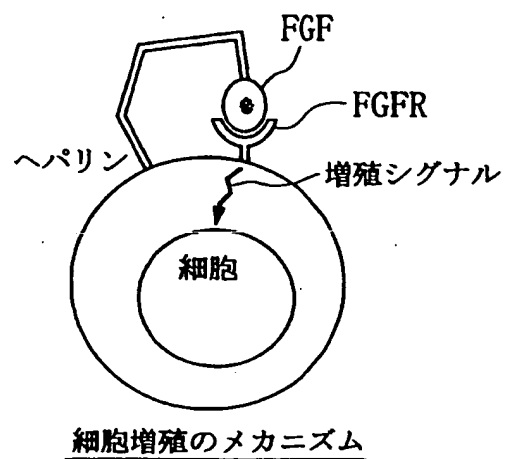
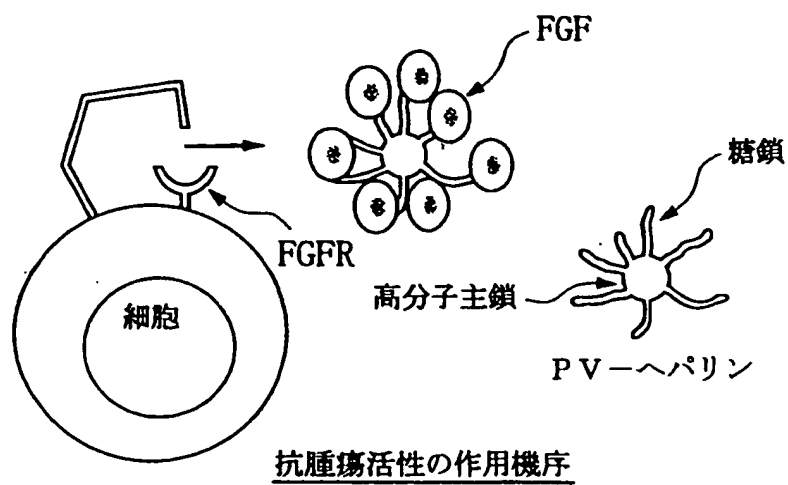


図 2



2 / 3

図 3

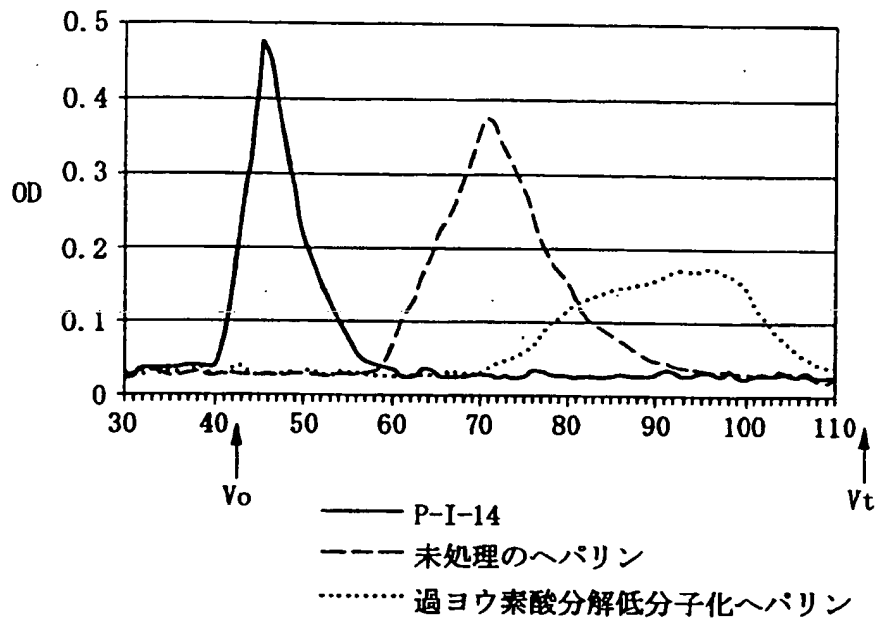


図 4

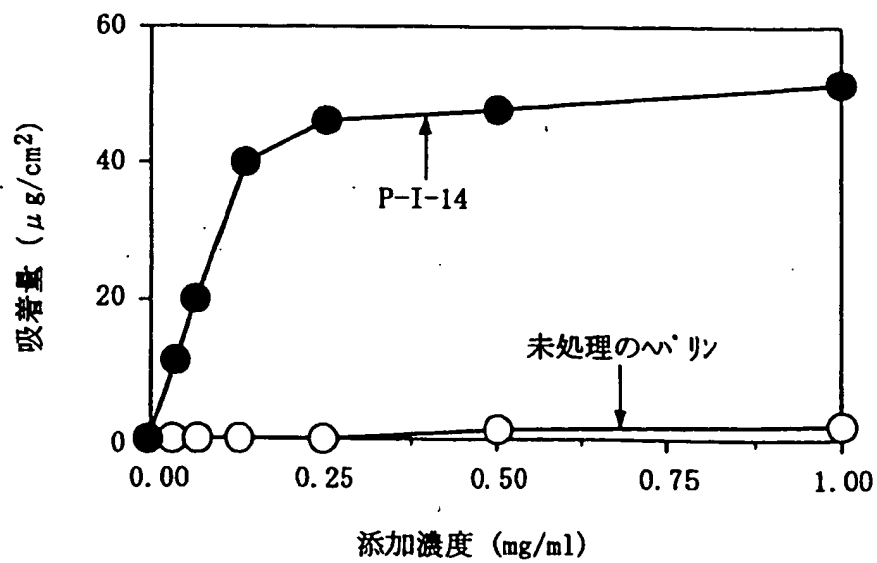
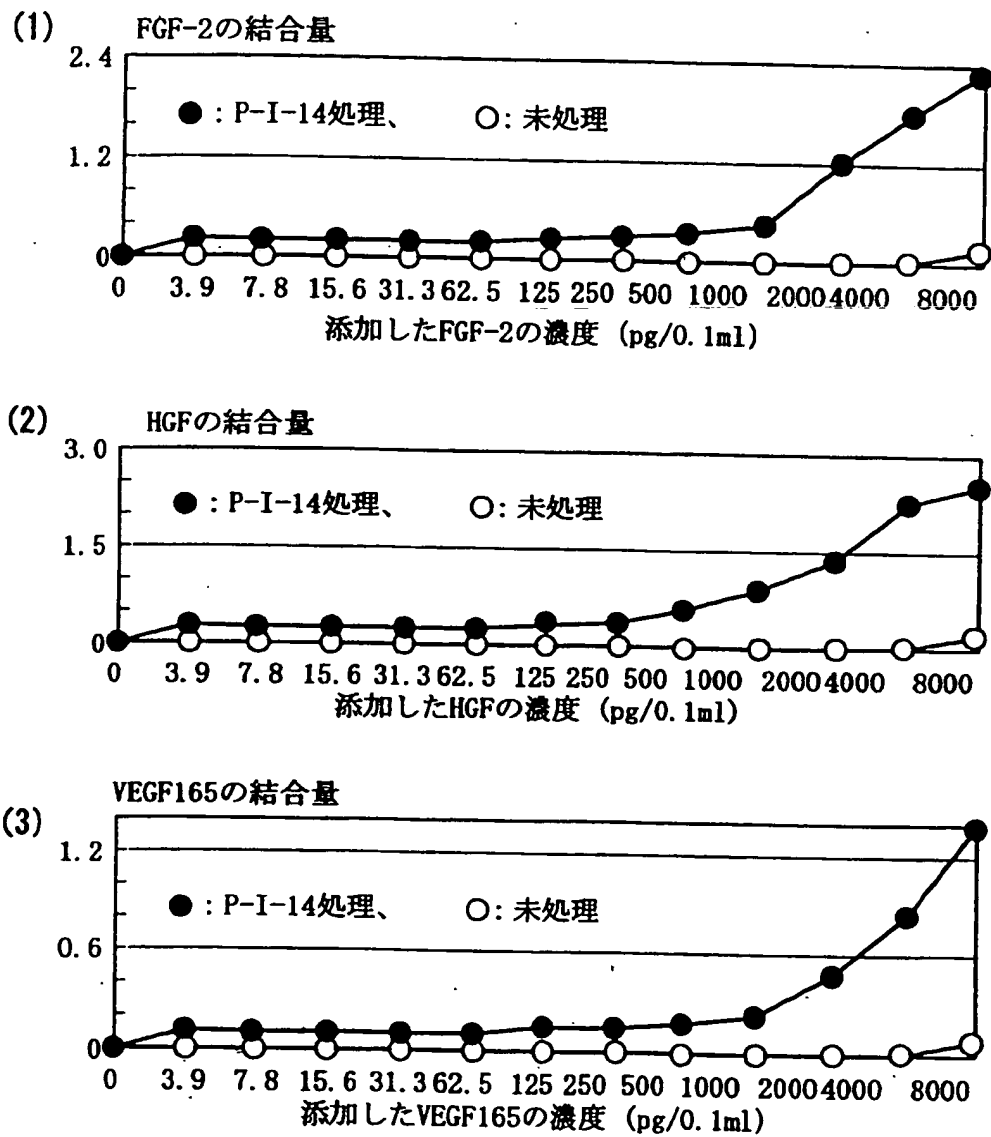


図 5



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/02012

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C08F246/00, 8/00, C08B37/00, A61K31/785, A61P35/00,
G01N33/48, C12M3/00, A61L2/16

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C08F246/00, 8/00, 8/34, C08B37/00-37/18

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS ONLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP, 10-324702, A (Huels AG), 08 December, 1998 (08.12.98), Claims; Par. No. [0010] & EP, 878491, A2	1-5
X	JP, 8-504841, A (M.U.R.S.T. Italian Ministry for University and Scientific and Technological Research), 28 May, 1996 (28.05.96), Claims & EP, 648229, A1	1-4, 6
X	JP, 6-510783, A (Corline Systems AB), 01 December, 1994 (01.12.94), Claims & WO, 93/5793, A1 & EP, 658112, A1	1-5
X	JP, 8-85704, A (SEIKAGAKU CORPORATION), 02 April, 1996 (02.04.96), Claims & EP, 693499, A1	1-4

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not
considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing
date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is
cited to establish the publication date of another citation or other
special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other
means
"P" document published prior to the international filing date but later
than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or
priority date and not in conflict with the application but cited to
understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered novel or cannot be considered to involve an inventive
step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered to involve an inventive step when the document is
combined with one or more other such documents, such
combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
23 June, 2000 (23.06.00)

Date of mailing of the international search report
04 July, 2000 (04.07.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl. ⁷ C08F246/00, 8/00, C08B37/00, A61K31/785, A61P35/00, G01N33/48, C12M3/00, A61L2/16		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl. ⁷ C08F246/00, 8/00, 8/34, C08B37/00-37/18		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CAS ONLINE		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP, 10-324702, A (ヒュールス アクチエンゲゼルシ ヤフト); 8. 12月. 1998 (08. 12. 98), 特許請求 の範囲, [0010] & EP, 878491, A2	1-5
X	JP, 8-504841, A (ミニステロ・デル・ウニベルシタ ・エ・デルラ・リシエルカ・シエンティフィカ・エ・テクノロジ カ)、28. 5月. 1996 (28. 05. 96), 特許請求の範 囲 & EP, 648229, A1	1-4, 6
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 23. 06. 00	国際調査報告の発送日 04.07.00	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 内田 靖恵 電話番号 03-3581-1101 内線 3457	4 J 9553

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	J P, 6-510783, A (コルリーネ・システムズ・アクチエボラージュ), 1. 12月. 1994 (01. 12. 94), 特許請求の範囲 &WO, 93/5793, A1 &EP, 658112, A1	1-5
X	J P, 8-85704, A (生化学工業株式会社), 2. 4月. 1996 (02. 04. 96), 特許請求の範囲 &EP, 693499, A1	1-4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/02012

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C08F246/00, 8/00, C08B37/00, A61K31/785, A61P35/00,
G01N33/48, C12M3/00, A61L2/16

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ C08F246/00, 8/00, 8/34, C08B37/00-37/18

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAS ONLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP, 10-324702, A (Huels AG), 08 December, 1998 (08.12.98), Claims; Par. No. [0010] & EP, 878491, A2	1-5
X	JP, 8-504841, A (M.U.R.S.T. Italian Ministry for University and Scientific and Technological Research), 28 May, 1996 (28.05.96), Claims & EP, 648229, A1	1-4, 6
X	JP, 6-510783, A (Corline Systems AB), 01 December, 1994 (01.12.94), Claims & WO, 93/5793, A1 & EP, 658112, A1	1-5
X	JP, 8-85704, A (SEIKAGAKU CORPORATION), 02 April, 1996 (02.04.96), Claims & EP, 693499, A1	1-4

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not
considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing
date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is
cited to establish the publication date of another citation or other
special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other
means
"P" document published prior to the international filing date but later
than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or
priority date and not in conflict with the application but cited to
understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered novel or cannot be considered to involve an inventive
step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered to involve an inventive step when the document is
combined with one or more other such documents, such
combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
23 June, 2000 (23.06.00)

Date of mailing of the international search report
04 July, 2000 (04.07.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO0/02012

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.

C08F246/00, 8/00, C08B37/00, A61K31/785, A61P35/00, G01N33/48, C12M3/00, A61L2/16

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.

C08F246/00, 8/00, 8/34, C08B37/00-37/18

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS ONLINE

C. 関連すると認められる文献

引用文献の
カテゴリー*

引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示

関連する
請求の範囲の番号

X

JP, 10-324702, A (ヒュールス アクチエンゲゼルシヤフト); 8. 12月. 1998 (08. 12. 98), 特許請求の範囲, [0010] & EP, 878491, A2

1-5

X

JP, 8-504841, A (ミニステロ・デル・ユニベルシタ・エ・デルラ・リシエルカ・シエンティフィカ・エ・テクノロジー); 28. 5月. 1996 (28. 05. 96), 特許請求の範囲 & EP, 648229, A1

1-4, 6

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

23. 06. 00

国際調査報告の発送日

04.07.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

内田 靖恵

4 J 9553

電話番号 03-3581-1101 内線 3457

様式PCT/ISA/210 (第2ページ) (1998年7月)

国際調査報告

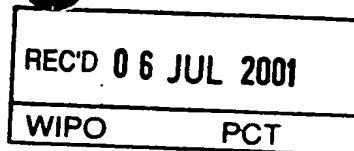
国際出願番号 PCT/JP00/02012

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP, 6-510783, A (コルリーネ・システムズ・アクチエボラーク), 1. 12月. 1994 (01. 12. 94), 特許請求の範囲 &WO, 93/5793, A1 &EP, 658112, A1	1-5
X	JP, 8-85704, A (生化学工業株式会社), 2. 4月. 1996 (02. 04. 96), 特許請求の範囲 &EP, 693499, A1	1-4

PCT


国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
[PCT36条及びPCT規則70]



出願人又は代理人 の書類記号 IB1692NET	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/ IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP00/02012	国際出願日 (日.月.年) 30.03.00	優先日 (日.月.年) 02.04.99
国際特許分類 (IPC) Int. Cl. C08F246/00, 8/00, C08B37/00, A61K31/785, A61P35/00, G01N33/48, C12M3/00, A61L2/16		
出願人 (氏名又は名称) 株式会社ネーテック		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (PCT36条) の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。 <input checked="" type="checkbox"/> この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。 (PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照) この附属書類は、全部で 1 ページである。
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。 I <input checked="" type="checkbox"/> 国際予備審査報告の基礎 II <input type="checkbox"/> 優先権 III <input type="checkbox"/> 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成 IV <input type="checkbox"/> 発明の単一性の欠如 V <input checked="" type="checkbox"/> PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明 VI <input type="checkbox"/> ある種の引用文献 VII <input type="checkbox"/> 国際出願の不備 VIII <input type="checkbox"/> 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 27.10.00	国際予備審査報告を作成した日 20.06.01	
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 内田 靖恵	4 J 9553 
		電話番号 03-3581-1101 内線 3457

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
PCT規則70.16, 70.17)

☐ 出願時の国際出願書類

☒ 明細書 第 1-20 ページ、 出願時に提出されたもの
明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

☒ 請求の範囲 第 2-3 項、 出願時に提出されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
請求の範囲 第 1, 5-6 項、 30.03.01 付の書簡と共に提出されたもの

☒ 図面 第 1/3-3/3 ページ/図、 出願時に提出されたもの
図面 第 _____ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
図面 第 _____ ページ/図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

☐ 明細書 第 _____ ページ
☒ 請求の範囲 第 4 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

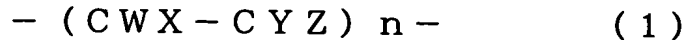
新規性 (N)	請求の範囲	6	有
	請求の範囲	1-3, 5	無
進歩性 (IS)	請求の範囲	6	有
	請求の範囲	1-3, 5	無
産業上の利用可能性 (IA)	請求の範囲	1-3, 5-6	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

請求の範囲1-3, 5に記載された発明は、国際調査報告で引用された文献1(JP, 6-510783, A(コルリーネ・システムズ・アクチエボラーク), 1.12月.1994(01.12.94), 特許請求の範囲)及び文献2(JP, 8-85704, A(生化学工業株式会社), 2.4月.1996(02.04.96), 特許請求の範囲, 【0017】)に記載されているから新規性を有しない。

請求の範囲

1（補正後）．下記一般式（1）：



（上記式中、Wはグリコサミノグリカンを構成する基本骨格の少なくとも一部に相当する構造を有し、2～50個の構成二糖体から構成され、当該構成二糖体が平均1個以上の硫酸基を有する糖鎖を表し、X、Y及びZは水素原子を含む任意の置換基を表し、nは1以上の繰り返し単位数を示す）で表される構造を有する機能化高分子。

2．前記糖鎖が天然グリコサミノグリカンの化学分解によって得られる分解糖鎖であり、当該分解糖鎖が、その化学分解によって生じた官能基を介して高分子主鎖に結合していることを特徴とする請求項1記載の機能化高分子。

3．前記グリコサミノグリカンが、ヘパリン／ヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、あるいはそれらの部分的脱硫酸化修飾体であることを特徴とする請求項1または2記載の機能化高分子。

4．（削除）

5（補正後）．請求項1から3のいずれかに記載の機能性高分子で表面修飾したことを特徴とする医療器具。

6（補正後）．請求項1から3のいずれかに記載の機能性高分子を含んでなる細胞成長制御薬。



国際調査報告

(法 8 条、法施行規則第40、41条)
〔PCT 18条、PCT規則43、44〕

出願人又は代理人 の書類記号 IB1692NET	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO0/02012	国際出願日 (日.月.年) 30.03.00	優先日 (日.月.年) 02.04.99
出願人 (氏名又は名称) 株式会社ネーテック		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条 (PCT 18条) の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない (第 I 欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している (第 II 欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第 III 欄に示されているように、法施行規則第47条 (PCT規則38.2(b)) の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から 1 カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 2 図とする。 ☒ 出願人が示したとおりである。

☐ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁷C08F246/00, 8/00, C08B37/00, A61K31/785, A61P35/00,
G01N33/48, C12M3/00, A61L2/16

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁷

C08F246/00, 8/00, 8/34, C08B37/00-37/18

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS ONLINE

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP, 10-324702, A (ヒュールス アクチエンゲゼルシヤフト); 8. 12月. 1998 (08. 12. 98), 特許請求の範囲, [0010] & EP, 878491, A2	1-5
X	JP, 8-504841, A (ミニステロ・デル・ユニベルシタ・エ・デルラ・リシエルカ・シエンティフィカ・エ・テクノロジーカ); 28. 5月. 1996 (28. 05. 96), 特許請求の範囲 & EP, 648229, A1	1-4, 6

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

23. 06. 00

国際調査報告の発送日

04.07.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

内田 靖恵



4 J

9553

電話番号 03-3581-1101 内線 3457

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	J P, 6-510783, A (コルリーネ・システムズ・アクチエボラージュ), 1. 12月. 1994 (01. 12. 94), 特許請求の範囲 & WO, 93/5793, A1 & EP, 658112, A1	1-5
X	J P, 8-85704, A (生化学工業株式会社), 2. 4月. 1996 (02. 04. 96), 特許請求の範囲 & EP, 693499, A1	1-4

97
Translation
09/937991
6000

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference IB1692NET	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP00/02012	International filing date (day/month/year) 30 March 2000 (30.03.00)	Priority date (day/month/year) 02 April 1999 (02.04.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C08F 246/00, 8/00, C08B 37/00, A61K 31/785, A61P 35/00, G01N 33/48, C12M 3/00, A61L 2/16		
Applicant NETECH INC.		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>3</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of <u>1</u> sheets.</p>
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>

Date of submission of the demand 27 October 2000 (27.10.00)	Date of completion of this report 20 June 2001 (20.06.2001)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/02012

I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:
pages _____ 1-20 _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the claims:
pages _____ 2-3 _____, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages _____ 1.5-6 _____, filed with the letter of _____ 30 March 2001 (30.03.2001)
- ☒ the drawings:
pages _____ 1/3-3/3 _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☒ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☒ the claims, Nos. _____ 4 _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/02012

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	6	YES
	Claims	1-3,5	NO
Inventive step (IS)	Claims	6	YES
	Claims	1-3,5	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-3,5-6	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

The inventions described in claims 1 to 3 and 5 are described in document 1 [JP, 6-510783, A (Corline Systems AB), 1 December 1994 (01.12.94), claims] and document 2 [JP, 8-85704, A (SEIKAGAKU CORPORATION), 2 April 1996 (02.04.96), Claims, paragraph 0017] cited in the ISR, and therefore do not appear to possess novelty.